

ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ПАРИЕТАЛЬНОЙ КОРЕ И ГИППОКАМПЕ КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

БОНЬ Е.И., МАКСИМОВИЧ Н.Е., ЗИМАТКИН С.М.

Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2018. – Том 17, №1. – С. 43-49.

CYTOCHEMICAL DISTURBANCES IN THE PARIETAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS OF RATS AFTER INCOMPLETE ISCHEMIA

BON L.I., MAKSIMOVICH N.Ye., ZIMATKIN S.M.

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2018;17(1):43-49.

Резюме.

Цереброваскулярные заболевания, в том числе инсульт, занимают лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности во всем мире. Решение проблемы инсульта предполагает углубленное изучение его патогенеза, для чего необходимо выявление морфофункциональных изменений на клеточном, субклеточном и молекулярном уровне.

Цель – изучение энергетических нарушений нейронов парietальной коры и гиппокампа крыс с субтотальной ишемией головного мозга.

Материал и методы. опыты выполнены на самках беспородных белых крыс массой 230 ± 20 г. Использование крыс в качестве экспериментальных животных обусловлено сходством ангиоархитектоники и морфологии коры головного мозга у крыс и человека. Субтотальную ишемию головного мозга моделировали путем перевязки обеих общих сонных артерий в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40-50 мг/кг).

Результаты. Субтотальная ишемия головного мозга приводит к изменению метаболизма в нейронах парietальной коры и гиппокампа. В цитоплазме нейронов парietальной коры и гиппокампа происходит снижение активности дегидрогеназ: никотинамидадениндинуклеотида (НАДН), сукцината, глюкозо-6-фосфата, возрастание активности лактатдегидрогеназы и кислой фосфатазы.

Заключение. Таким образом, субтотальная ишемия головного мозга приводит к тяжелому энергетическому дефициту нейронов парietальной коры и гиппокампа крыс. В большей степени нарушения выражены в парietальной коре, нейроны которой более чувствительны к недостатку кислорода.

Ключевые слова: цитохимические нарушения, парietальная кора, гиппокамп, ишемия.

Abstract.

Cerebrovascular diseases, including stroke, take a leading position in the structure of morbidity and mortality in the whole world. Solving the problem of stroke requires an in-depth study of its pathogenesis, for which it is necessary to identify morphofunctional changes at the cellular, subcellular and molecular levels.

Objectives. To study energy disorders of neurons of the parietal cortex and hippocampus of rats with subtotal cerebral ischemia. Material and methods. The experiments were performed on white female rats weighing 230 ± 20 g. The use of rats as experimental animals is determined by the similarity of angioarchitectonics and morphology of the cerebral cortex in rats and humans. Incomplete cerebral ischemia was modelled by ligation of both common carotid arteries under intravenous thiopental anesthesia (40-50 mg / kg).

Results. Incomplete cerebral ischemia leads to a change of metabolism in the neurons of the parietal cortex and the hippocampus. In the cytoplasm of the neurons of the parietal cortex and the hippocampus, the dehydrogenases activity decreases: that of NADH, succinate, glucose-6-phosphate; lactate dehydrogenase and acid phosphatase activity increases.

Conclusions. Thus, incomplete ischemia of the brain leads to severe energy deficiency of the neurons of the parietal cortex and hippocampus of rats. To a greater extent these disturbances are expressed in the parietal cortex, the neurons of which are more sensitive to lack of oxygen.

Key words: cytochemical disorders, parietal cortex, hippocampus, ischemia.

Цереброваскулярные заболевания, в том числе инсульт, занимают лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности во всем мире. Ежегодно в мире от них умирает около 6 миллионов человек. В Республике Беларусь цереброваскулярные заболевания и мозговой инсульт являются одной из основных причин смертности и инвалидизации населения. До 85% всех инсультов обусловлено ишемией головного мозга. Согласно данным литературы нейроны неокортекса больших полушарий головного мозга, (ГМ) и гиппокампа являются наиболее чувствительными к недостатку кислорода. Признаки повреждения нейронов при ишемии ГМ выявляются уже спустя 2 минуты вследствие снижения энергообразования, нарушения транспорта потенциал-определяющих ионов, эксайтотоксичности, изменения кислотно-основного состояния, возникновения окислительного и нитрозативного стресса и апоптоза [1, 2].

Решение проблемы инсульта предполагает углубленное изучение его патогенеза, для чего необходимо выявление морфологических, биохимических и функциональных изменений на клеточном, субклеточном и молекулярном уровне.

Одним из начальных этапов ишемического каскада повреждения ГМ является энергодифицит. Для его изучения используются методы, позволяющие оценивать степень поглощения кислорода митохондриями [3, 4]. Особенности цитохимических изменений нейронов различных отделов коры головного мозга при его ишемии в сравнительном аспекте изучены недостаточно.

Цель работы – изучение энергетических нарушений нейронов париетальной коры и гиппокампа крыс с субтотальной ишемией ГМ.

Материал и методы

Опыты выполнены на 20 самках беспородных белых крыс массой 230 ± 20 г (по 10 животных в каждой группе). При проведении экспериментов соблюдались все требования Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей [5]. Животных содержали в кондиционируемом помещении (22°C) при смешанном освещении на стандартном рационе вивария и свободном доступе к корму и воде, группами не более 5-ти особей в клетке вивария Гродненского государственного медицинского университета (Беларусь).

Использование крыс в качестве экспери-

ментальных животных обусловлено сходством ангиоархитектоники и морфологии коры головного мозга у крыс и человека. Субтотальную ишемию головного мозга (далее – ИГМ) моделировали путем перевязки обеих общих сонных артерий в условиях внутривенного тиопенталового наркоза ($40\text{--}50$ мг/кг). Животных декапитировали после 60-минутной ишемии. Контрольную группу (контроль) составили ложнооперированные крысы аналогичных пола и массы, которым воспроизводились все манипуляции, за исключением перевязки сосудов.

После декапитации осуществляли извлечение головного мозга, кусочки коры больших полушарий замораживали в жидком азоте. В срезах толщиной 10 мкм, изготовленных в криостате Leica CM 1840, Германия (-12°C), в нейронах пятого слоя париетальной коры и пирамидального слоя поля СА1 гиппокампа определяли активность дегидрогеназ: никотинамидадениндинуклеотида (НАДН-ДГ: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.6.93.3; по Нахласу и др., 1958), сукцината (СДГ: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.3.99.1; по Нахласу и др., 1957), глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф-ДГ, Д-глюкозо-6-фосфат: НАДФ-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.49; по Гесс, Скарпелли, Пирсу, 1958), лактата (ЛДГ; L = лактат: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27; по Гесс и др., 1958) и маркерного фермента лизосом – кислой фосфатазы (КФ, фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты; КФ 3.1.3.2; по Гомори, 1950) [6].

Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование и цитометрию проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США). Расположение париетальной коры и поля СА₁ гиппокампа коры в гистологических препаратах мозга крыс определяли с помощью стереотаксического атласа [7]. У каждого животного оценивали не менее 20 нейронов пятого слоя париетальной коры и пирамидального слоя поля СА₁ гиппокампа.

Полученные значения анализировали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Количественные данные представлены в виде $Me(LQ;UQ)$, где Me – медиана, LQ – значение нижнего квартиля; UQ – значение верхнего квартиля. Различия между контрольной и опытной группами считали достоверными при $p < 0,05$ (Mann-WhitneyU-test) [8].

Результаты и обсуждение

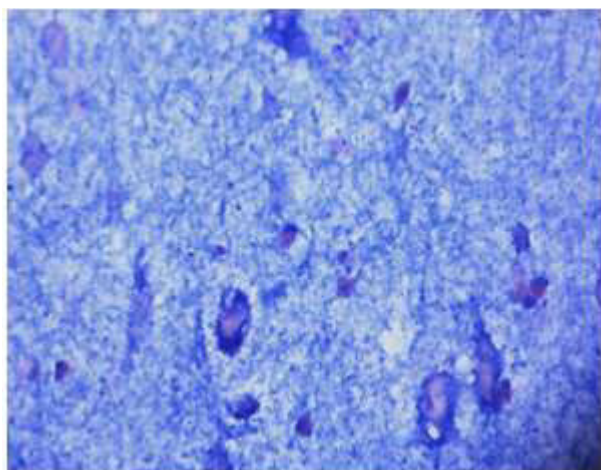
У крыс с ИГМ отмечалось снижение активности НАДН-ДГ в цитоплазме нейронов пятого слоя парietальной коры (на 24% ($p<0,05$)) и пирамидного слоя поля СА₁ гиппокампа (на 23% ($p<0,05$)) (рис. 1, 2, табл. 1).

Также выявлено снижение активности СДГ: на 39% ($p<0,05$) – в цитоплазме нейронов пятого слоя парietальной коры и на 30% ($p<0,05$) – в цитоплазме нейронов пирамидного слоя поля СА₁ гиппокампа и Г-6-Ф-ДГ: на 31% ($p<0,05$) – в цитоплазме нейронов пятого слоя парietальной коры и на 23% ($p<0,05$) – в цитоплазме нейронов пирамидного слоя поля СА₁ гиппокампа, увеличение активности ЛДГ: на 22% ($p<0,05$) – в цито-

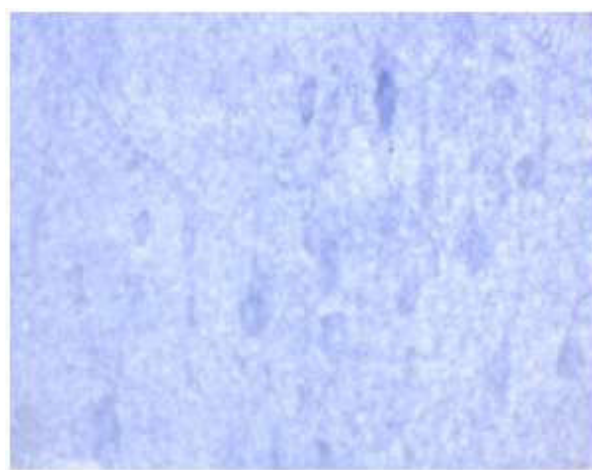
плазме нейронов пятого слоя парietальной коры и пирамидного слоя поля СА₁ гиппокампа и КФ: на 31% ($p<0,05$) – в цитоплазме нейронов в цитоплазме нейронов пятого слоя парietальной коры и на 23% ($p<0,05$) – в цитоплазме нейронов пирамидного слоя поля СА₁ гиппокампа (рис. 3, 4, 5, табл. 1).

Заключение

Субтотальная ишемия головного мозга продолжительностью 60 минут приводит к изменению метаболизма в нейронах парietальной коры и гиппокампа. В цитоплазме нейронов происходит снижение активности маркерных ферментов митохондрий: НАДН-ДГ – фермента,

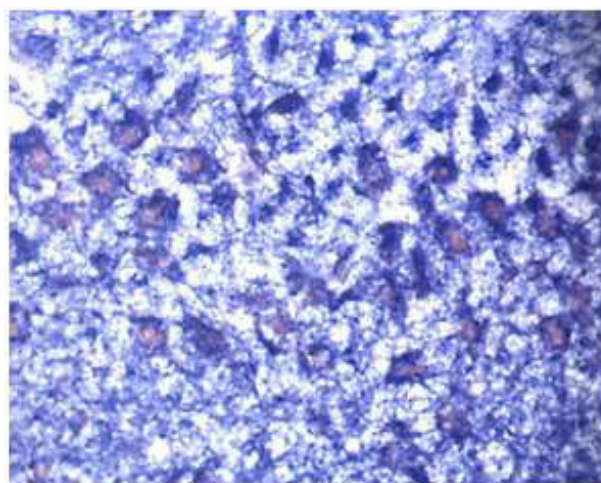


А

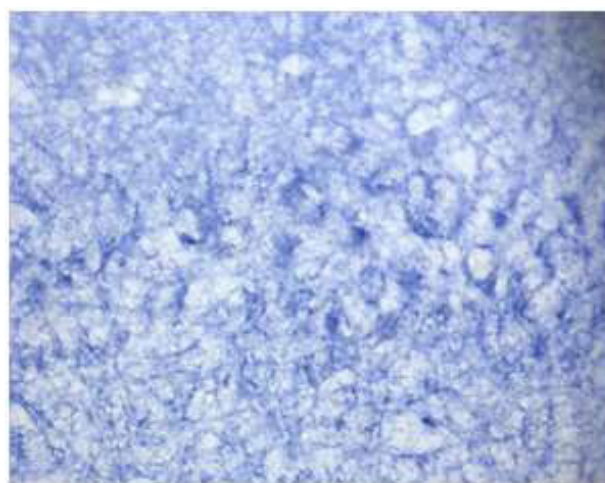


Б

Рисунок 1 – Высокая активность НАДН-ДГ в нейронах 5-го слоя парietальной коры мозга крыс контрольной группы – А и ее снижение в опытной группе – Б. Цифровая микрофотография. Ув. 400.



А



Б

Рисунок 2 – Высокая активность НАДН-ДГ в нейронах пирамидного слоя поля СА₁ гиппокампа крыс контрольной группы – А и ее снижение в опытной группе – Б. Цифровая микрофотография. Ув. 400.

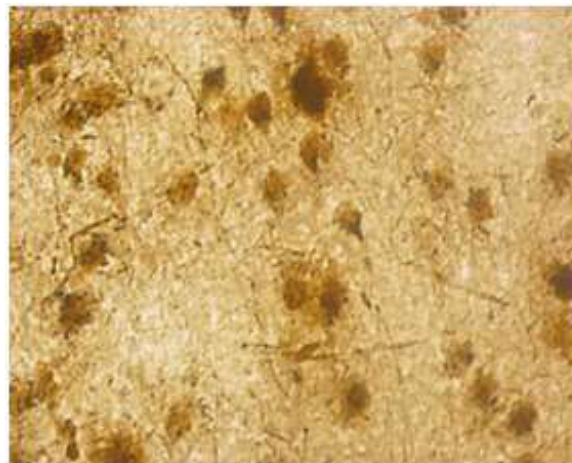
Таблица 1 – Активность ферментов в цитоплазме нейронов пятого слоя париетальной коры и пирамидного слоя поля СА₁ гиппокампа (Me (LQ; UQ), в единицах оптической плотности)

| Группы | Отделы коры головного мозга | |
|----------|-----------------------------|--------------------|
| | париетальная кора | гиппокамп |
| НАДН-ДГ | | |
| контроль | 0,21 (0,20; 0,26) | 0,22 (0,19; 0,26) |
| опыт | 0,16 (0,15; 0,18)* | 0,17 (0,16; 0,18)* |
| СДГ | | |
| контроль | 0,18 (0,16; 0,19) | 0,17 (0,16; 0,18) |
| опыт | 0,11(0,1; 0,12)* | 0,12 (0,11; 0,13)* |
| Г-6-Ф-ДГ | | |
| контроль | 0,23 (0,22; 0,25) | 0,22 (0,2; 0,24) |
| опыт | 0,16 (0,13; 0,19)* | 0,17 (0,16; 0,18)* |
| ЛДГ | | |
| контроль | 0,11 (0,1; 0,13) | 0,14 (0,13; 0,15) |
| опыт | 0,14 (0,13; 0,15)* | 0,18 (0,17; 0,19)* |
| КФ | | |
| контроль | 0,22 (0,2; 0,24) | 0,24 (0,2; 0,25) |
| опыт | 0,32 (0,3; 0,35)* | 0,31 (0,3; 0,39) |

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.



А



Б

Рисунок 3 – Активность КФ в нейронах 5-го слоя париетальной коры крыс контрольной группы – А и ее повышение в опытной группе – Б. Цифровая микрофотография. Ув. 400.

участвующего в переносе электронов с НАДН на убихинон и являющегося важным связующим звеном между циклом Кребса и электронно-транспортной цепью, СДГ – ключевого фермента аэробного окисления сукцината в митохондриях, а также внемитохондриального фермента Г-6-Ф-ДГ, связанного с пентозофосфатным путем. Происходит компенсаторное возрастание активности ЛДГ как показателя анаэробного гликолиза и маркерного фермента лизосом КФ, отражающего возрастание процесса аутофагии, направленного на удаление поврежденных мембран и органелл в нейронах [3]. Отмеченные изменения свиде-

тельствуют о нарушении энергетического обмена нейронов париетальной коры и гиппокампа, что ведет к снижению их функциональной активности и гибели. В большей степени нарушения выражены в париетальной коре, нейроны которой более чувствительны к недостатку кислорода.

Данные цитохимических исследований согласуются с результатами, полученными при изучении ультраструктуры нейронов при ИГМ. Отмечаются изменения в митохондриях: они набухают и распределяются в цитоплазме неравномерно, кристы их разрушаются. Снижение количества митохондрий, количества и длины их



Рисунок 4 – Активность КФ в нейронах пирамидного слоя поля СА1 гиппокампа крыс контрольной группы – А и ее повышение в опытной группе – Б. Цифровая микрофотография. Ув. 400.

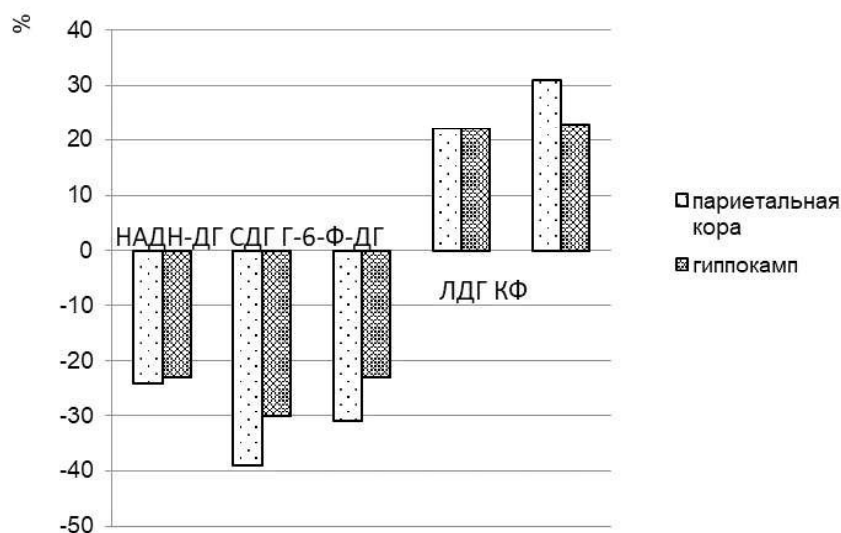


Рисунок 5 – Степень и направление изменения активности ферментов в цитоплазме нейронов 5-го слоя париетальной коры и пирамидного слоя поля СА1 гиппокампа крыс с ИГМ:
НАДН-ДГ – НАДН-дегидрогеназа, СДГ – сукцинатдегидрогеназа, Г-6-Ф-ДГ – глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, КФ – кислая фосфатаза.

крист свидетельствует о нарушении энергетического обеспечения нейронов [9, 10].

Набухание митохондрий приводит к разрыву наружной мембраны, затем растяжению внутренней мембраны, нарушению ее барьерных свойств (прежде всего для катионов) и к полному разрушению данных органелл. Происходит изменение конфигурации канальцев гранулярной и гладкой эндоплазматической сети. Увеличивается число свободных рибосом вследствие их отсоединения от мембран гранулярной эндоплазматической сети. При гипоксическом повреждении нейрон сокращает экспорт белка и стремится

направить максимальное его количество на внутренние потребности [11]. Это является одним из проявлений формирующегося в клетке энергодифицита: фиксация рибосом к мембранам шероховатого эндоплазматического ретикулума, происходящая при участии белка рибофорина, является энергозависимым процессом. Возрастает общее количество и размеры лизосом. Выходят в цитоплазму и активизируются их гидролитические ферменты – катепсины, рибонуклеаза, кислая фосфатаза, дезоксирибонуклеаза, гиалуронидаза и другие ферменты, запуская в клетке процессы аутофагии [9-12].

При инициации механизмов ишемии в нейронах головного мозга происходит увеличение $[H^+]$ с развитием ацидоза и $[Ca^{2+}]$. В результате повышения содержания $[Ca^{2+}]$ происходит активация ферментов, ведущих к дезорганизации метаболизма, а также к нарушению возбудимости и повышению проницаемости плазматической мембраны для ионов [13, 14].

Нарушение внутриклеточного кальциевого гомеостаза играет одну из ведущих ролей в нейродегенеративных процессах в мозге при его ишемии наряду с такими факторами, как глутаматергическая сигнальная трансдукция, оксидативный стресс, воспаление, что в совокупности приводит к апоптозу нейронов [13, 14].

Таким образом, субтотальная ишемия головного мозга приводит к тяжелому энергетическому дефициту нейронов парietальной коры и гиппокампа крыс. В большей степени нарушения выражены в парietальной коре, нейроны которой более чувствительны к недостатку кислорода.

Литература

1. Epidemiological characteristics of lacunar infarcts in a population / S. E. Sacco [et al.] // *Stroke*. – 1991 Oct. – Vol. 22, N 10. – P. 1236–1241.
2. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury / B. C. White [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 2000 Oct. – Vol. 179, N S 1/2. – P. 1–33.
3. Chalmers, G. R. Adaptability of the oxidative capacity of motoneurons / G. Chalmers, R. R. Roy, V. R. Edgerton // *Brain. Res.* – 1992 Jan. – Vol. 570, N 1/2. – P. 1–10.
4. Oxidative damage of rat liver mitochondria during exposure to t-butyl hydroperoxide. Role of Ca^{2+} ions in oxidative

processes / I. B. Zavodnik [et al.] // *Life Scis.* – 2013 Jan. – Vol. 92, N 23. – P. 1110–1117.

5. The Correcting Effects of Dihydroquercetin in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury / N. Y. Maksimovich [et al.] // *Biomed. Khim.* – 2014 Nov-Dec. – Vol. 60, N 6. – P. 643–650.
6. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes : (text with EEA relevance) // *Official J. Eur. Union*. – 2010 Oct. – Vol. 53, N L 276. – P. 33–79.
7. Пирс, Э. Гистохимия: теоретическая и прикладная / Э. Пирс. – М.: Изд-во иностран. лит., 1962. – 962 с.
8. Paxinos, G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – 6th ed. – London : Academic Press, 2007. – 456 p.
9. Батин, Н. В. Компьютерный статистический анализ данных : учеб.-метод. пособие / Н. В. Батин. – Минск : Ин-т подгот. науч. кадров НАН Беларуси, 2008. – 160 с.
10. Gallyas, F. Supravital microwave experiments support that the formation of «dark» neurons is propelled by phase transition in an intracellular gel system / F. Gallyas, J. Pal, P. Bukovics // *Brain. Res.* – 2009 May. – Vol. 1270. – P. 152–156.
11. Giffard, R. G. Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes / R. G. Giffard, R. A. Swanson // *Glia*. – 2005 Jun. – Vol. 50, N 4. – P. 299–306.
12. Generalization of seizures parallels the formation of «dark» neurons in the hippocampus and pontine reticular formation after focal-cortical application of 4-aminopyridine (4-AP) in the rat / P. Baraskay [et al.] // *Brain. Res.* – 2008 Sep. – Vol. 1228. – P. 217–228.
13. Chan, P. H. Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia / P. H. Chan // *Neurochem. Res.* – 2004 Nov. – Vol. 29, N 11. – P. 1943–1949.
14. Chen, H. The role of Na-K-Cl co-transporter in cerebral ischemia / H. Chen, D. Sun // *Neurol. Res.* – 2005 Apr. – Vol. 27, N 3. – P. 280–286.

Поступила 15.12.2017 г.

Принята в печать 31.01.2018 г.

References

1. Sacco SE, Whisnant JP, Broderick JP, Phillips SJ, O'Fallon WM. Epidemiological characteristics of lacunar infarcts in a population. *Stroke*. 1991 Oct;22(10):1236-41.
2. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci*. 2000 Oct 1;179(S 1-2):1-33.
3. Chalmers GR, Roy RR, Edgerton VR. Adaptability of the oxidative capacity of motoneurons. *Brain Res*. 1992 Jan;570(1-2):1-10.
4. Zavodnik IB, Dremza IK, Cheshchevik VT, Lapshina EA, Zamaraewa M. Oxidative damage of rat liver mitochondria during exposure to t-butyl hydroperoxide. Role of Ca^{2+} ions in oxidative processes. *Life Sci*. 2013 Jun;92(23):1110-7. doi: 10.1016/j.lfs.2013.04.009
5. Maksimovich NY, Dremza IK, Troian EI, Maksimovich

YN, Borodinski AN. The Correcting Effects of Dihydroquercetin in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Biomed Khim*. 2014 Nov-Dec;60(6):643-50.

6. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes: (text with EEA relevance). *Official J Eur Union*. 2010 Oct;53(L 276):33-79.
7. Pirs E. Histochemistry: theoretical and applied. Moscow, RF: Izd-vo inostran lit; 1962. 962 p. (In Russ.)
8. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. London: Academic Press; 2007. 456 p.
9. Batin NV. Computer statistical data analysis: ucheb-metod posobie. Minsk, RB: In-t podgot nauch kadrov NAN Belarusi; 2008. 160 p. (In Russ.)
10. Gallyas F, Pál J, Bukovics P. Supravital microwave experiments support that the formation of «dark» neurons

- is propelled by phase transition in an intracellular gel system. *Brain Res.* 2009 May;1270:152-6. doi: 10.1016/j.brainres.2009.03.020
11. Giffard RG, Swanson RA. Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes. *Glia.* 2005;50(4):299-306.
12. Baracska P, Szepesi Z, Orbán G, Juhász G, Czúrkó A. Generalization of seizures parallels the formation of "dark" neurons in the hippocampus and pontine reticular formation after focal-cortical application of 4-aminopyridine (4-AP) in the rat. *Brain Res.* 2008 Sep;1228:217-28. doi: 10.1016/j.brainres.2008.06.044
13. Chan PH. Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *Neurochem Res.* 2004 Nov;29(11):1943-9.
14. Chen H, Sun D. The role of Na-K-Cl co-transporter in cerebral ischemia. *Neurol Res.* 2005 Apr;27(3):280-6. doi: 10.1179/016164105X25243

Submitted 15.12.2017

Accepted 31.01.2018

Сведения об авторах:

Бонь Е.И. – ассистент кафедры патологической физиологии им. Д.А. Маслакова, Гродненский государственный медицинский университет;

Максимович Н.Е. – д.м.н., профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии им. Д.А. Маслакова, Гродненский государственный медицинский университет;

Зиматкин С.М. – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии, Гродненский государственный медицинский университет.

Information about authors:

Bon L.I. – lecturer of the Chair of Pathological Physiology named after D.A. Maslakov, Grodno State Medical University;

Maksimovich N.Ye. – Doctor of Medical Sciences, professor, head of the Chair of Pathological Physiology named after D.A. Maslakov, Grodno State Medical University;

Zimatkin S. M. – Doctor of Biological Sciences, professor, head of the Chair of Histology, Cytology & Embryology, Grodno State Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80, Гродненский государственный медицинский университет, кафедра патологической физиологии им. Д.А. Маслакова. E-mail: e_bon@list.ru – Бонь Елизавета Игоревна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 230009, Grodno, 80, Gorky str., Grodno State Medical University, Chair of Pathological Physiology named after D.A. Maslakov. E-mail: e_bon@list.ru – Lizaveta I. Bon.